DOI:10.16016/j.2097-0927.202407057

肠型胃癌的超级增强子重塑特征及上调迁移诱导蛋白*CEMIP*表达的作用研究

彭仕银[1],谭玉婷[1],薛 锐[1],李先锋[2],王 涛[2],储召乐[2],刘碧颖[2],陈东凤[2],王 斌[1,2] [1]重庆大学医学院,重庆;[2]陆军特色医学中心(第三军医大学大坪医院)消化内科,消化系统肿瘤精准防治重庆市重点实验室,重庆

[**摘要**] **目的** 绘制肠型胃癌的超级增强子重塑图谱,揭示超级增强子的肿瘤生物学功能及可能激活的下游靶基因。**方法** 收集陆军特色医学中心消化内科2022年1-12月收治行内镜检查、治疗的患者的31例正常胃黏膜组织、23例肠型胃癌组织及9例肠型胃癌类器官进行靶向组蛋白H3K27ac修饰的染色质靶向捕获(cleavage under targets and tagmentation, CUT&Tag)测序,基于生物信息学工具描绘肠型胃癌的超级增强子重塑特征并鉴定关键靶基因;利用CRISPRi技术干预超级增强子,Western blot检测靶基因的表达,并采用CCK-8法和Transwell迁移、侵袭实验检测对照组细胞及干预组细胞的增殖、迁移、侵袭能力。**结果** 肠型胃癌组织与正常胃黏膜组织超级增强子信号差异明显($P<0.05$),癌组织中的活性超级增强子可能参与免疫系统的负向调节、细胞黏附等生物学过程;在肿瘤细胞中表达上调的细胞迁移诱导蛋白(cell migration-inducing protein,CEMIP)受到超级增强子的调控,干预超级增强子后肿瘤细胞CEMIP蛋白表达量下降($P<0.05$),细胞增殖率、相对迁移面积和相对侵袭面积也随之下降($P<0.05$)。**结论** 肠型胃癌发生了超级增强子重塑,其下游靶基因*CEMIP*可促进癌细胞生长、迁移和侵袭。

[**关键词**] 肠型胃癌;组蛋白H3K27ac;超级增强子;细胞迁移诱导蛋白
[**中图法分类号**] R394.3;R730.23;R735.2 [**文献标志码**] A

Remodeling characteristics of super-enhancers in intestinal gastric cancer and their roles in upregulating *CEMIP* expression

PENG Shiyin[1], TAN Yuting[1], XUE Rui[1], LI Xianfeng[2], WANG Tao[2], CHU Zhaole[2], LIU Biying[2], CHEN Dongfeng[2], WANG Bin[1,2] [1]School of Medicine, Chongqing University, Chongqing; [2]Department of Gastroenterology, Chongqing Key Laboratory of Precise Prevention and Treatment of Digestive Malignancies, Army Medical Center of PLA/Daping Hospital of Third Military Medical University, Chongqing, China

[**Abstract**] **Objective** To map the super-enhancers remodeling of intestinal gastric cancer and reveal the tumor biological functions of the super-enhancers and the downstream target genes that may be activated. **Methods** A total of 31 normal gastric mucosal tissues, 23 intestinal gastric cancer tissues and 9 intestinal gastric cancer organoids were collected from the Department of Gastroenterology of Army Medical Center of PLA from January to December 2022. Chromatin targeting histone H3K27ac modified chromatin targeting cleavage under targets and tagmentation (CUT&Tag) sequencing was conducted on above tissues. The remodeling profiles of super-enhancers in intestinal gastric cancer were analyzed and the key target genes were identified based on bioinformation tools. CRISPRi technology was used to intervene with the super-

[**基金项目**] 国家自然科学基金优秀青年科学项目(81822032);重庆市自然科学基金杰出青年项目(CSTC2019JCYJJQX0027)
[**通信作者**] 王 斌,E-mail: wb_tmmu@126.com

2097-0927/Copyright © 2025, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)
引用格式:彭仕银,谭玉婷,薛锐,等. 肠型胃癌的超级增强子重塑特征及上调迁移诱导蛋白*CEMIP*表达的作用研究[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(05):396-406. DOI:10.16016/j.2097-0927.202407057.

Citation: PENG S Y, TAN Y T, XUE R, *et al*. Remodeling characteristics of super-enhancers in intestinal gastric cancer and their roles in upregulating *CEMIP* expression[J]. J Army Med Univ, 2025, 47(5): 396-406. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202407057.

enhancers, the expression of target genes was detected with Western blotting, and the proliferation, migration and invasion abilities were detected by CCK-8 assay and Transwell chambers in the control group and the intervention group. **Results** There was a significant difference in the signal of super-enhancers between intestinal gastric cancer tissues and normal gastric mucosal tissues ($P<0.05$), and the active super-enhancers in cancer tissues may be involved in biological processes such as negative regulation of the immune system and cell adhesion. The expression of up-regulated cell migration-inducing protein (*CEMIP*) in tumor cells was regulated by the super-enhancers, and intervening the super-enhancers down-regulated the expression of *CEMIP* ($P<0.05$), and inhibited the cell proliferation, invasion and migration abilities of tumor cells ($P<0.05$). **Conclusion** Super-enhancer remodeling is observed in intestinal gastric cancer, and they can up-regulate the expression of *CEMIP* gene and promote the growth, migration and invasion of cancer cells.

[**Key words**] intestinal gastric cancer; histone H3K27ac; super enhancer; cell migration-inducing protein

Supported by the National Natural Science Foundation for Excellent Young Scientists of China (81822032) and the Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars of Chongqing (CSTC2019JCYJJQX0027). Corresponding author: WANG Bin, E-mail: wb_tmmu@126.com

胃癌是我国乃至全世界常见的恶性肿瘤之一,居我国恶性肿瘤发病率第五、死亡率第三[1]。我国胃癌患者确诊时大多已是进展期,且接受传统治疗的疗效较差[2]。基于Lauren分型,胃癌分为肠型、弥漫型和混合型,其中肠型胃癌发病率较高[3],其主要由幽门螺旋菌感染引起的慢性萎缩性胃炎、肠化、异型增生进展形成。肠型胃癌作为一种独特病理组织学亚型,亟待深入研究其发病机理,发现新干预靶点。肿瘤的发生发展是一系列复杂的过程,肿瘤细胞的异质性和表型可塑性被认为是该过程中的主要驱动因素[4],其中,表观调控的异常可能发挥重要作用[5]。表观调控方式主要包括组蛋白修饰、DNA甲基化、染色质重塑和非编码RNA等。表观调控紊乱常通过基因组活性元件实现对基因表达的异常调控,以H3K27ac修饰为标志的超级增强子是其中的重要内容。

细胞迁移诱导蛋白(cell migration-inducing protein, CEMIP)被报道在肿瘤中发挥促癌基因的作用,其在多种肿瘤中表达上调,可促进肿瘤细胞侵袭及转移,然而其异常高表达的表观调控机制尚未完全阐明。本研究利用染色质靶向捕获测序(cleavage under targets and tagmentation, CUT&Tag)技术,系统性绘制肠型胃癌中的超级增强子重塑图谱,初步揭示肠型胃癌细胞中超级增强子的功能状态及其下游靶基因生物学功能,为肠型胃癌的防治提供新的靶点和干预思路。

1 材料与方法

1.1 临床样本来源

本研究共纳入正常胃黏膜组织31例、肠型胃癌组织23例、肠型胃癌类器官9例,均来自陆军特色医学中心消化内科2022年1-12月收治的行内镜检查和治疗的患者。样本经内镜下活检或内镜下胃黏膜剥离术后获得,并经过2名病理科医师确认病理状态后用液氮保存。肠型胃癌样本纳入标准:经内镜、病理检查确诊为肠型胃癌。排除标准:①凝血功能障碍;②内镜下治疗过程中因特殊原因终止或由于病变范围过小不满足取样条件。本研究已经陆军特色医学中心伦理委员会审批通过[医研伦审(2021)第260号],样本采集均获患者知情同意。

1.2 CUT&Tag建库及测序

取冻存胃癌组织,充分研磨后利用碘沙醇梯度溶液提取细胞核并用台盼蓝染色计数,收集10^5个细胞核,使用CUT&Tag试剂盒(南京诺唯赞公司,#TD903)以及H3K27ac抗体(中国爱博泰克公司,#A7253),按照试剂盒说明书进行文库构建并上机测序。

1.3 转录组建库及测序

对胃癌组织样本进行RNA抽提并质控,检测RNA是否降解(RIN值≥7),选择RNA含量≥1 μg的样本进行后续操作。使用rRNA去除试剂盒(美国Illumina公司)获取mRNA并进行片段化处理。随后反转录合成双链cDNA,对cDNA进行接头连接、纯化,PCR扩增并再次质检,上机测序。

1.4 数据分析

1.4.1 CUT&Tag及RNA-seq测序数据分析 分别下载CUT&Tag及RNA-seq测序仪下机数据,对于CUT&Tag测序数据,分析流程如下:使用Fastp[6]进行初步数据质控、Cutadapt[7]进行接头序列去除、Bowtie2[8]进行人hg38参考基因组比对、Samtools[9]进行低质量片段过滤、MACS2[10]进行基因组H3K27ac信号峰寻找[11]、ChIPseeker[12]进行信号峰区域注释。

对于RNA-seq测序数据,分析流程如下:使用Fastp进行初步数据质控、Sortmerna[13]进行rRNA去除、Hisat2[14]进行人hg38参考基因组比对、Samtools进行低质量及重复片段过滤,使用RSeQC[15]再次进行数据质控,评估数据测序饱和度、DNA片段分布,最后使用FeatureCounts[16]工具进行基因表达定量。

1.4.2 超级增强子鉴定 使用MACS2寻找出的H3K27ac信号峰根据其所处的基因组位置,将位于基因转录起始位点(transcription start site,TSS)上下游2 000个碱基内的信号峰定义为启动子元件,其余信号峰定义为增强子元件[17]。利用MAnorm2[18]工具对增强子信号峰进行合并,获取到样本间的共识增强子,用FeatureCounts对共识增强子区域进行H3K27ac信号强度定量。鉴定出增强子区域后,根据各增强子区H3K27ac信号强度,利用Rose2算法鉴定共识超级增强子,并进行超级增强子注释。

1.4.3 差异分析 利用FeatureCounts工具对各样本的超级增强子区域H3K27ac修饰信号峰强度进行定量分析,使用DESeq2[19]计算肠型胃癌组织与正常胃黏膜组织之间的差异超级增强子[差异倍数(fold change,FC)≥1.5,P<0.05]。对于RNA测序数据,将基因定量结果进行标准化处理后,使用DESeq2鉴定肠型胃癌组织与正常胃黏膜组织之间的差异表达基因(FC≥1.5,P<0.05)。

1.4.4 基因本体论(Gene Ontology,GO)富集分析 提取差异表达基因,使用clusterProfiler工具包[20]指定富集条目为"BP(biological process)",P<0.05时认为预测结果具有统计学意义。

1.4.5 单细胞转录组数据分析 下载已发表胃癌数据集HRA000051[26]原始数据,使用Cell Ranger工具对数据进行人hg38参考基因组比对及定量,得到单细胞表达矩阵。对于每个独立的胃癌组织样本,使用Seurat工具包[21]导入并进行数据基础分析。①去除低质量细胞,去除标准:细胞UMI数<1 000,表达的基因数量<500或>6 000,细胞表达的线粒体相关基因占比>50%;②表达矩阵归一化、计算高度可变基因、PCA主成分分析:将剩余的细胞使用"NormalizeData"函数进行归一化、使用"FindVariableFeatures"函数寻找高变基因,选择前2 000个高变基因进行后续主成分分析(principal component analysis,PCA);③降维:根据PCA主成分分析结果,选择前20个主要成分进行umap降维;④去除双胞:使用DoubletFinder工具包[22]进行双胞预测,提取单胞后依次进行归一化、高变基因计算、PCA主成分分析、降维处理;⑤合并样本、去除批次效应:使用Harmony工具包[23]进行样本合并,根据指定的样本批次来源用"RunHarmony"函数去除各样本之间存在的批次效应,随后使用Seurat工具包针对合并后的样本进行降维和无监督聚类;⑥细胞注释:使用SingleR工具包[24]对数据进行初步细胞类型预测,随后使用已发表胃癌单细胞转录组数据中各细胞亚群的标志基因[25]对工具包预测结果进行验证和补充;⑦差异分析:提取上皮细胞亚群,根据*CEMIP*基因的表达量中位数将上皮细胞划分为*CEMIP*高表达组和*CEMIP*低表达组。使用Seurat工具包"FindMarkers"函数,指定*CEMIP*高表达细胞为比较组,*CEMIP*低表达细胞为对照组计算差异基因(FC>0.25,P<0.05)。

1.4.6 上皮细胞良恶性评分 参考既往文献提出的胃上皮细胞良恶性区分办法[26],首先计算TCGA-STAD肿瘤样本与正常样本之间的差异基因,分别取肿瘤组织以及正常组织中表达上调的前50个差异基因,组成"肿瘤相关基因集"和"正常相关基因集",使用Seurat工具包的"AddModuleScore"函数对上皮细胞亚群打分,根据得分使用K-means聚类将上皮细胞分为2类:肿瘤上皮细胞和正常上皮细胞。随后计算两者间的差异基因,取"肿瘤上皮"中表达上调的前50个差异基因作为"肿瘤相关基因集",取"正常上皮"中表达上调的前50个差异基因作为"正常相关基因集",再次对上皮细胞亚群进行打分并聚类。重复以上过程,直至上皮细胞分类结果趋于稳定。将"肿瘤相关基因集"得分高的上皮细胞亚群定义为恶性上皮细胞,将"正常相关基因集"得分高的上皮细胞亚群定义为正常上皮细胞,随后使用恶性细胞标志基因、通路富集等方式对以上分类结果进行验证。

1.4.7 代谢活性评分 选择*CEMIP*高表达细胞和低表达细胞评估代谢活性,利用scMetabolism工具包[27]的"AUCell"算法,针对京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)数据库中多个细胞代谢通路对细胞进行代谢活性评分,得分越高者认为该代谢通路活性越强,P<0.05时认为预测结果具有统计学意义。

1.4.8 恶性生物学行为相关基因集评分 搜集已报道的肿瘤恶性生物学行为相关基因集[28-29],包括细胞黏附、上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition,EMT)、免疫逃逸、转移、血管生成、增殖和凋亡,用Seurat工具包的"AddModuleScore"函数计算并比较*CEMIP*高表达组及低表达组细胞的恶性生物学行为得分。

1.5 载体构建、细胞培养及感染

查看基因组上*CEMIP*超级增强子区域H3K27ac修饰情况,选取其中2段H3K27ac修饰较高的区域作

为候选片段进行干预。针对每个候选片段,于CRISPOR网站分别设计sgRNA,选择特异性得分最高的sgRNA进行引物合成,并分别连接至已酶切好的pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro载体上,转化、测序、扩增后在293T细胞(购自美国ATCC公司)中进行病毒包装,同时包装未连接sgRNA引物的空载体对照组慢病毒,得到CRISPRi慢病毒(CRISPRi抑制组1、CRISPRi抑制组2)及空载体病毒(对照组)进行后续实验。

人胃癌GTL-16细胞(购自比利时Academic Labs公司)在含10%胎牛血清和1%双抗的RPMI1640培养基中培养,并在37 ℃、5%CO_2的培养箱生长。细胞接种于6孔板中,细胞贴壁达板底面积40%~50%时,分别感染CRISPRi慢病毒(CRISPRi抑制组1、CRISPRi抑制组2)及空载体病毒(对照组)24 h后换液,继续培养至细胞贴壁达板底面积80%~90%时加入嘌呤霉素进行筛选,当野生型细胞被完全杀死呈漂浮状态时停止筛选,目的细胞更换为新鲜完全培养基进行后续实验。

1.6 CCK-8实验

取生长良好的CRISPRi抑制组1、CRISPRi抑制组2细胞和对照组细胞,并在室温下消化、离心(1 000 r/min,5 min)后,用完全培养基重悬并进行细胞计数,以约2×10^3个/孔接种于96孔板中,分别于第1、2、3、5天时使用CCK-8活力检测盒测定各孔450 nm处光密度值[D(450)]。

1.7 Transwell迁移、侵袭实验

1.7.1 迁移实验 将CRISPRi抑制组1、CRISPRi抑制组2细胞和对照组细胞进行消化、离心后,用无血清培养基重悬并进行细胞计数。取24孔板加入600 μL完全培养基,放入Transwell小室,根据细胞分组,每个小室加入1×10^5个细胞,标记后置于37 ℃、5%CO_2的培养箱培养48 h,取出细胞用多聚甲醛固定、结晶紫染色后显微镜下随机选取5个视野拍照,使用Image J软件计算相对迁移面积。

1.7.2 侵袭实验 同Transwell迁移实验,重悬CRISPRi抑制组1、CRISPRi抑制组2细胞及对照组细胞并进行细胞计数。取24孔板加入600 μL完全培养基,放入提前用基质胶包被的Transwell小室,于小室中加入2×10^5个细胞,标记后置于37 ℃、5%CO_2的培养箱培养48 h,取出细胞用多聚甲醛固定、结晶紫染色后显微镜下随机选取5个视野拍照,使用Image J软件计算相对侵袭面积。

1.8 Western blot检测

用RIPA裂解液处理CRISPRi抑制组1、CRISPRi抑制组2细胞和对照组细胞,制备蛋白溶液并测量各组蛋白浓度。各取40 μg蛋白溶液进行SDS-PAGE电泳,转至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉进行室温封闭1.5 h,根据目的蛋白孵育相应一抗抗体,于4 ℃摇床中孵育过夜。12 h后取出洗涤后室温孵育二抗抗体1.5 h,充分洗涤后进行曝光显影。使用Image J软件评估蛋白灰度值,目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值作为目的蛋白相对表达量。

1.9 统计学分析

使用SPSS 26.0和GraphPad Prism 9.0软件,符合正态分布的实验数据为计量资料,以$\bar{x}\pm s$表示。两组间比较采用独立样本t检验,$P<0.05$认为差异具有统计学意义。

2 结果

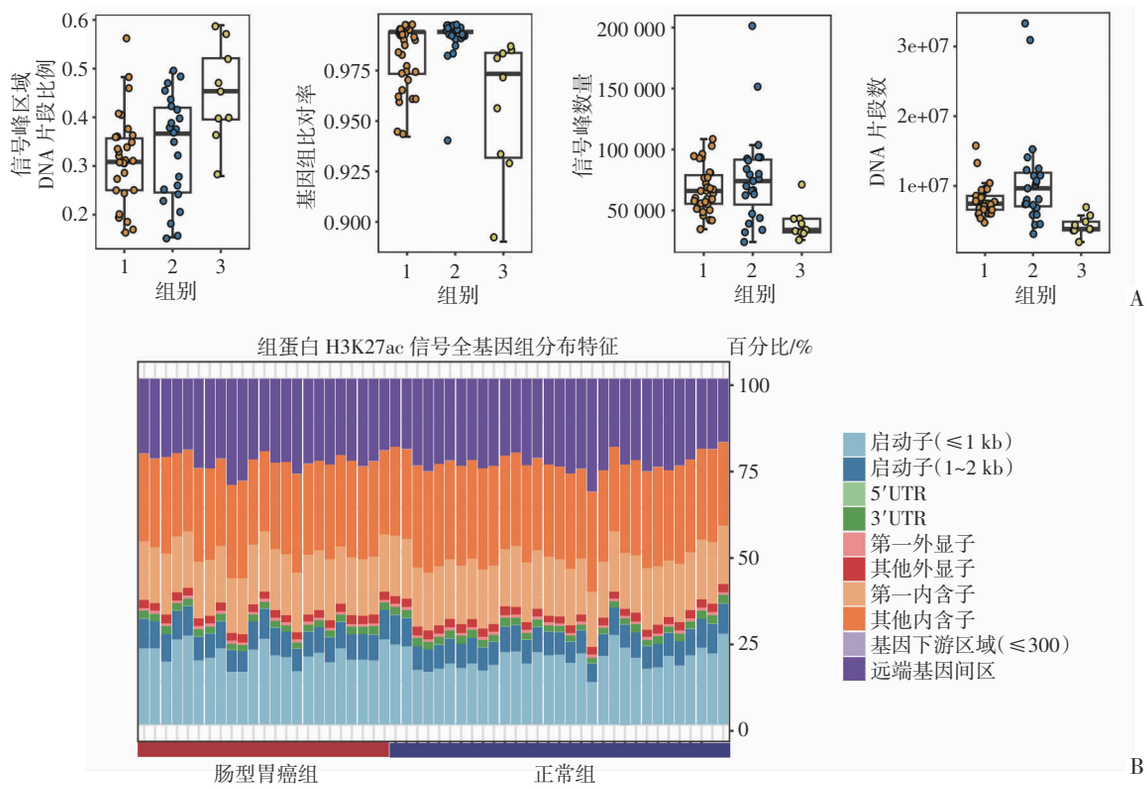
2.1 获取高质量CUT&Tag测序数据,绘制H3K27ac修饰的全基因组分布图谱

通过标准的质控流程对正常胃黏膜组织、肠型胃癌组织和肠型胃癌类器官进行靶向H3K27ac修饰的CUT&Tag建库及测序,以描述肠型胃癌组织组蛋白H3K27ac修饰特征。结果显示:CUT&Tag测序数据总DNA片段数均>5×10^6个,提示H3K27ac修饰信号足够用于下游分析;其基因组比对率均>85%,提示文库质量良好,无明显接头污染;位于信号峰区域的DNA片段分数均>10%,提示染色质上特定信号峰区域的H3K27ac信号富集较为特异;信号峰数量均>2×10^4个,提示H3K27ac信号富集较为集中(图1A)。据此,CUT&Tag测序数据均达到质控标准,满足下游分析要求。

系统分析胃黏膜组织H3K27ac的全基因组分布特征显示:胃癌组织、正常胃黏膜组织的H3K27ac信号主要分布于启动子、基因间及内含子区域(图1B),二者全基因组H3K27ac信号分布规律无明显差异。

2.2 肠型胃癌组织具有显著的超级增强子重塑特征

对肠型胃癌、正常胃黏膜组织样本的H3K27ac信号无监督聚类分析结果表明:肠型胃癌、正常胃黏膜组织明显聚为2类,且组间相关性较低;提示两种胃黏膜组织的H3K27ac修饰全局特征存在明显差异(图2A)。值得注意的是,正常胃黏膜组织各样本之间H3K27ac信号特征相关性较强,肠型胃癌组织各样本之间相关性较弱,提示正常胃黏膜组织各样本H3K27ac信号特征较为一致,而肿瘤组织内部H3K27ac信号特征则存在较大异质性(图2A)。



A:靶向H3K27ac修饰的CUT&Tag文库质量分析结果 1:正常组;2:肠型胃癌组;3:肠型胃癌类器官组;B:各样本组蛋白H3K27ac信号全基因组分布图谱

图1 CUT&Tag测序绘制的肠型胃癌的全基因组H3K27ac修饰图谱

进一步探究肠型胃癌与正常胃黏膜差异的超级增强子H3K27ac信号,利用ROSE2分析鉴定共发现5 219个超级增强子(图2B),DESeq2分析发现,两种组织存在816个差异的超级增强子H3K27ac信号峰,占全部信号峰数量的15.6%(图2C)。其中,肿瘤组织获得性超级增强子456个,占差异信号峰数量的55.9%,肿瘤组织丢失性超级增强子360个,占差异信号峰数量的44.1%(图2C),提示获得性超级增强子重编程是肠型胃癌的重要表观遗传学特征。

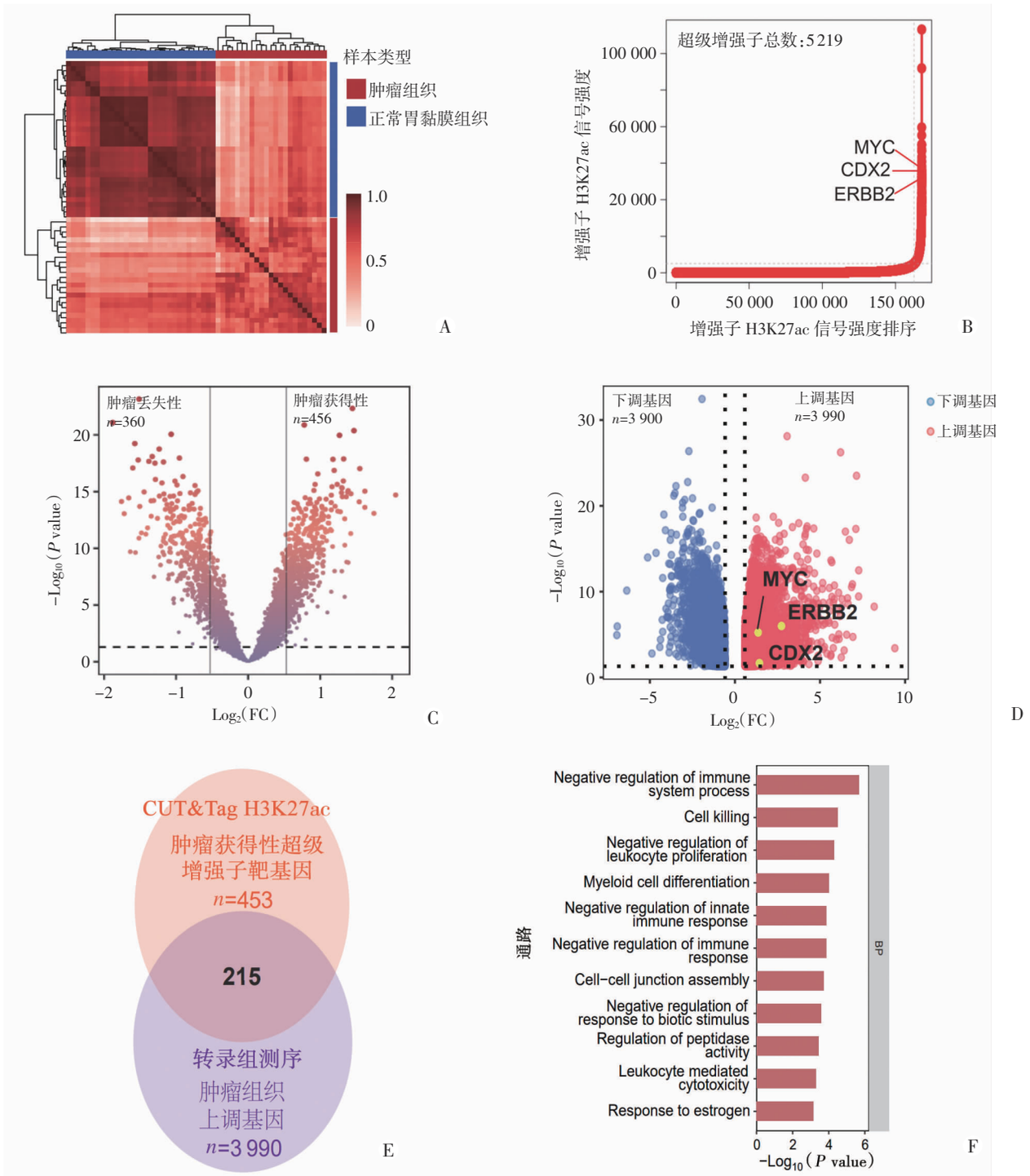
2.3 超级增强子重编程可能调控胃癌发生发展中多种恶性生物学行为

基于以下条件鉴定超级增强子下游靶基因:①该基因超级增强子区域H3K27ac修饰信号显著富集;②该基因mRNA表达水平随超级增强子区域H3K27ac修饰信号富集而上调。分析RNA-seq测序数据发现,较之正常胃黏膜,肠型胃癌组织共有3 990个基因表达显著上调,3 900个基因表达显著下调;其中,上调基因包括*MYC*、*CDX2*、*ERBB2*等胃癌发生相关基因(图2D)。结合超级增强子注释分析显示:*MYC*、*CDX2*、*ERBB2*等基因表达可能受到超级增强子调控(图2B、D),提示肿瘤组织获得性超级增强子的激活可能促进胃癌相关基因的表达。

为全面、准确鉴定出肿瘤组织获得性超级增强子下游靶基因,整合分析肠型胃癌和正常胃黏膜组织CUT&Tag H3K27ac测序数据和RNA测序数据,在肠型胃癌组织中共筛选出H3K27ac修饰信号显著富集和mRNA表达同步上调的基因共215个(图2E)。GO富集分析提示,以上215个肿瘤组织获得性超级增强子靶基因可能参与免疫系统的负向调节、淋巴细胞增殖的负向调节、细胞黏附、雌激素代谢等生物学过程(图2F),提示肿瘤组织超级增强子重编程可能正向调控细胞黏附等恶性生物学行为、负向调控抗肿瘤免疫。

2.4 超级增强子靶基因*CEMIP*在肠型胃癌组织中高表达

肿瘤上皮细胞在肿瘤的发生发展过程中扮演着核心角色,促癌相关基因异常表达导致肿瘤上皮细胞恶性行为的获得是肿瘤发展的重要驱动力,因此,鉴定肿瘤细胞中超级增强子重塑所调控的促癌靶基因具有重要意义。基于以上215个肿瘤组织获得性超级增强子及靶基因,根据以下标准确定候选验证靶基因:①超级增强子H3K27ac修饰信号在肠型胃癌类器官中显著富集(图3A);②超级增强子H3K27ac信号水



A:肠型胃癌及正常胃黏膜组织样本相关性聚类分析;B:肠型胃癌与正常胃黏膜组织中的超级增强子鉴定结果;C:肠型胃癌差异超级增强子火山图;D:肠型胃癌差异基因火山图;E:肿瘤组织获得性超级增强子下游关键靶基因鉴定策略;F:肿瘤获得性超级增强子下游靶基因生物学功能的预测结果

图2 肠型胃癌超级增强子的重塑特征及其生物学功能

平-靶基因表达水平呈显著正相关,且Spearman相关性系数>0.5(图3A、B)。结果显示:在以上215个肿瘤组织获得性超级增强子预测靶基因中,共有34个基因在肠型胃癌类器官中也受到超级增强子调控,其中7个基因的Spearman相关性系数>0.5,以*CEMIP*基因超级增强子信号排名最为靠前,*P*值最为显著(图3B)。采用IGV可视化显示,与正常胃黏膜组织相比,肠型胃癌组织及肠型胃癌类器官中*CEMIP*基因的超级增强子区

域H3K27ac信号明显增强(图3C)，提示*CEMIP*可能是肿瘤细胞中受超级增强子调控的重要促癌靶基因。

通过癌症和肿瘤基因图谱(the cancer genome atlas，TCGA)分析胃癌公共转录组数据发现，*CEMIP*在肿瘤组织中表达上调(P<0.05，图3D)，*CEMIP*高表达胃癌患者具有更短的总生存期(over survival，OS)(图3E)。提示肠型胃癌的超级增强子可上调*CEMIP*基因转录，导致在胃癌组织广泛高表达并促进肿瘤进展，进而导致患者预后不良。

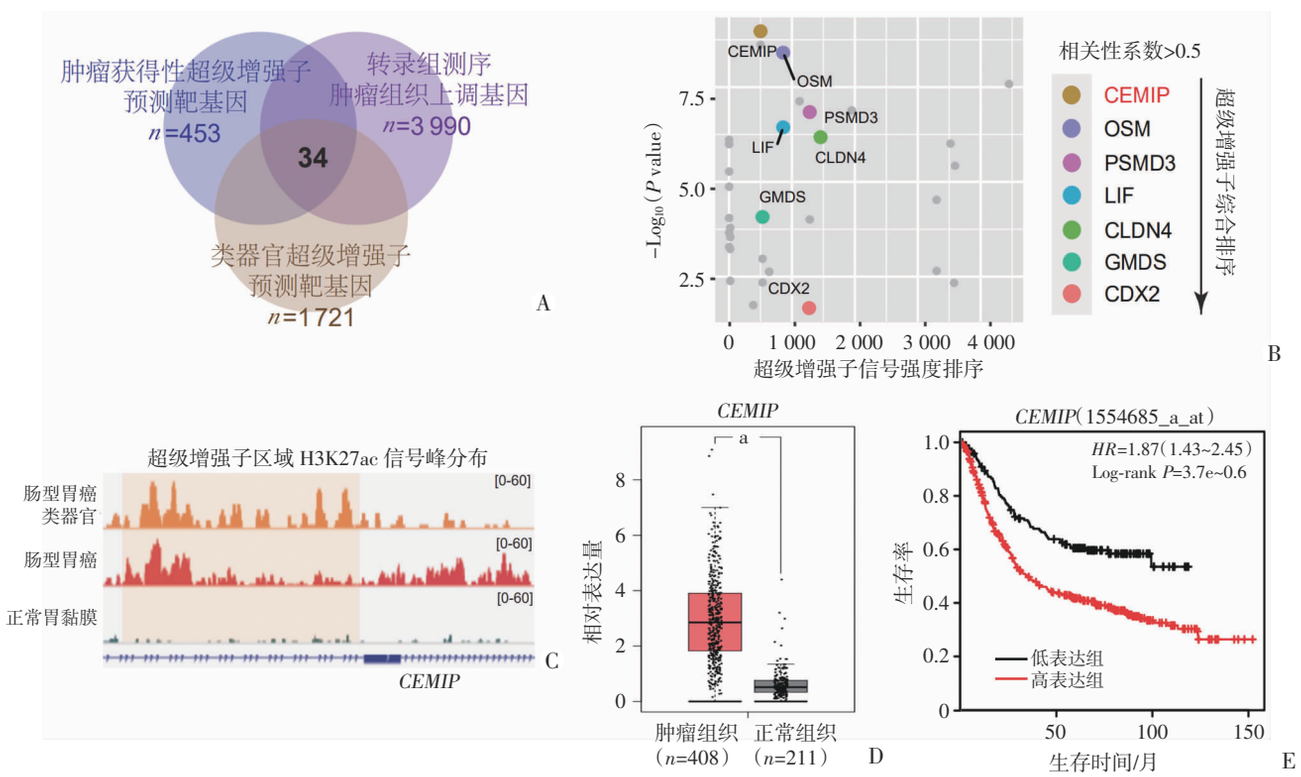
2.5 *CEMIP*可能调控多种恶性生物学过程

为明确超级增强子靶基因*CEMIP*在肿瘤细胞中的生物学功能以及潜在临床意义，分析胃癌单细胞转录组数据HRA000051结果显示：*CEMIP*主要高表达于上皮细胞中的恶性细胞亚群(图4A~D)，提示*CEMIP*表达可能与细胞恶性生物学行为密切相关。将上皮细胞分为*CEMIP*高表达亚群、*CEMIP*低表达亚群行差异分析及通路富集，结果显示：高表达*CEMIP*的上皮细胞亚群可能参与类固醇、脂肪酸及甘油酯代谢过程、细胞黏附过程，并负向调控免疫反应以及调控T细胞或NK细胞介导的细胞毒性作用(图4F)。利用单细胞代谢活性分析工具scMetabolism，对*CEMIP*高表达及低表达细胞亚群进行代谢活性打分，结果显示：*CEMIP*高表达亚群具有更高的类固醇激素生物合成、甘油磷脂代谢、脂肪酸生物合成活性(图4E)，与GO富集结果一致。

为明确*CEMIP*对细胞黏附、免疫逃逸等恶性生物学行为的调控作用，利用已报道的肿瘤恶性生物学行为相关基因集对*CEMIP*高表达及低表达细胞亚群进行打分，结果显示：*CEMIP*高表达细胞亚群具有更高的细胞黏附、上皮间质转化、免疫逃逸、转移、血管生成及恶性增殖评分，而凋亡评分较低(P<0.05，图4G)。以上结果说明*CEMIP*在恶性肿瘤细胞中表达上调，可能通过调控肿瘤细胞代谢、细胞增殖及黏附、血管生成、免疫逃逸等方式促进肿瘤细胞的恶性进展。

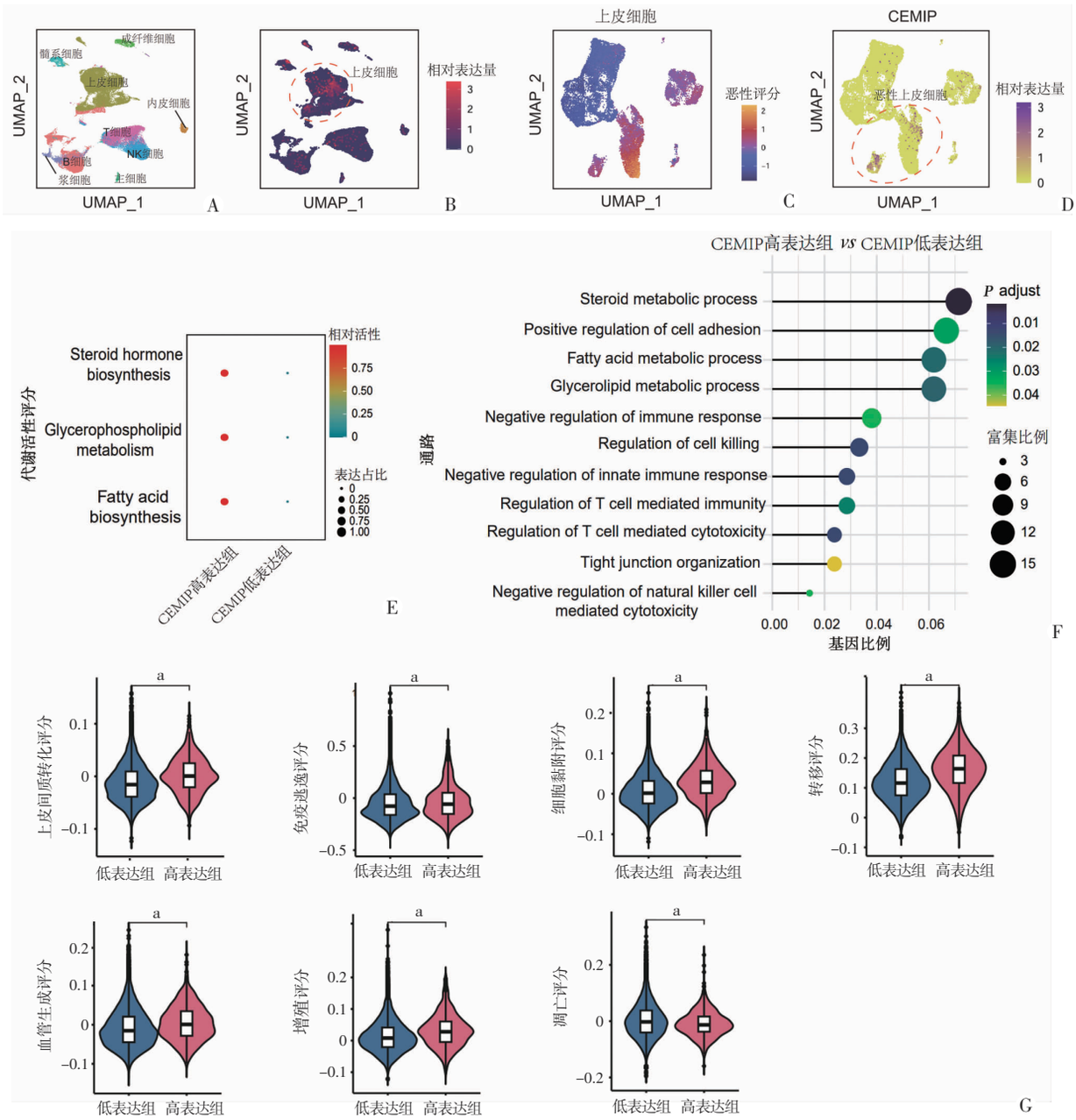
2.6 超级增强子通过调控*CEMIP*的表达促进细胞恶性生物学过程

为验证超级增强子对*CEMIP*基因表达的调控作用，利用CRISPRi技术在人胃癌细胞系GTL-16中抑制*CEMIP*超级增强子基因组上不同H3K27ac活性区域(图5A)，检测CEMIP蛋白表达水平，结果显示：与



A：超级增强子下游促癌靶基因的鉴定策略；B：肿瘤细胞超级增强子下游靶基因的显著性排序结果；C：正常胃黏膜组织、肠型胃癌组织和肠型胃癌类器官中*CEMIP*基因超级增强子区域H3K27ac信号的IGV可视化图；D：TCGA胃癌转录组数据中*CEMIP*基因在肿瘤组织与正常组织中的表达丰度比较 a：P<0.05；E：TCGA数据库中*CEMIP*高、低表达组预后生存曲线

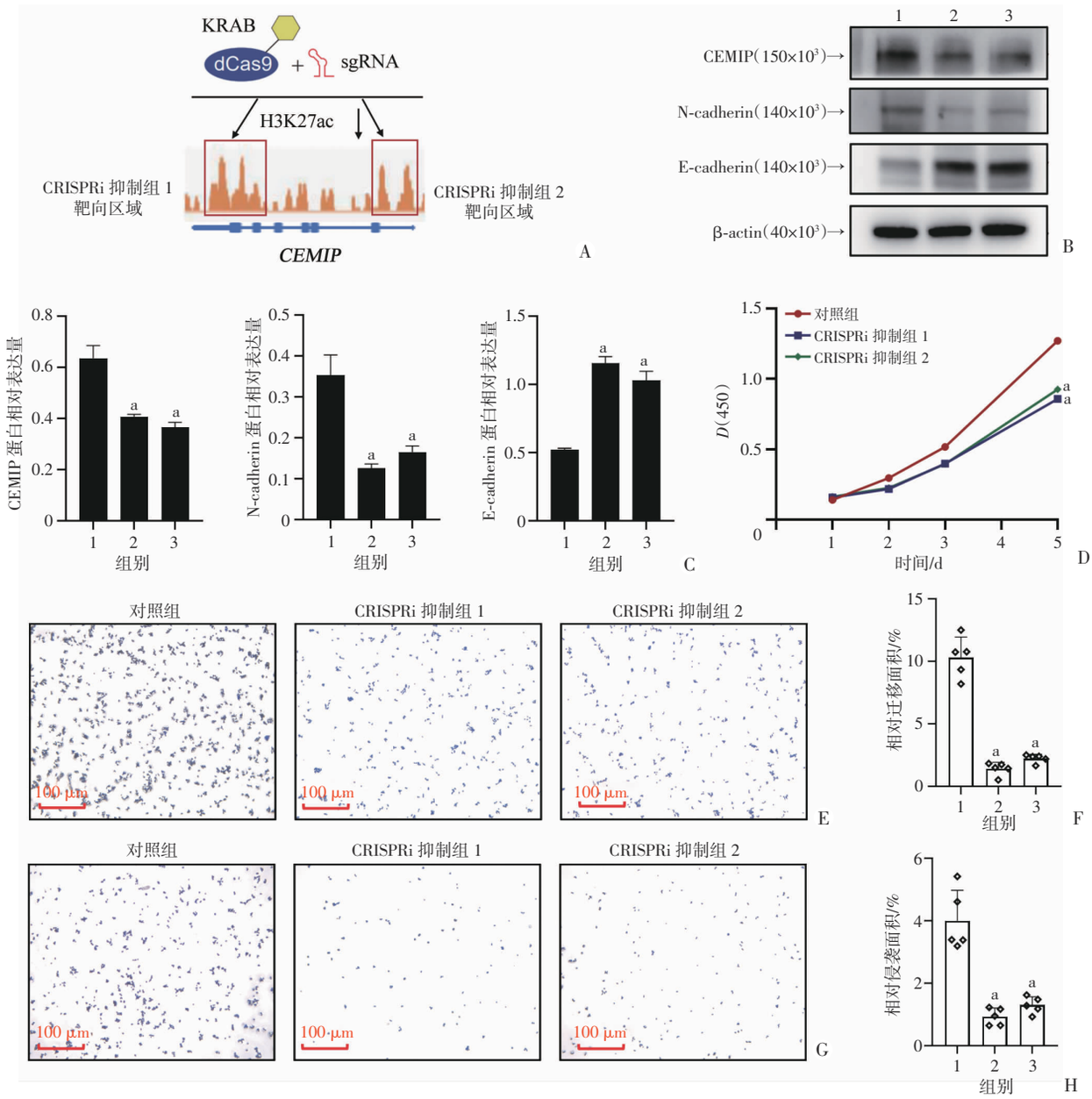
图3 *CEMIP*的超级增强子调控谱征



A:胃癌单细胞转录组数据降维聚类细胞分布图谱;B:*CEMIP*在胃癌单细胞数据中的表达情况;C:胃癌单细胞转录组数据恶性上皮细胞划分结果;D:*CEMIP*在上皮细胞中的表达情况;E:气泡图显示*CEMIP*高表达上皮细胞及*CEMIP*低表达上皮细胞代谢活性评分;F:GO富集分析显示*CEMIP*高表达上皮细胞差异基因生物学功能;G:小提琴图显示*CEMIP*高表达上皮细胞及低表达上皮细胞各生物学行为基因集评分　a:$P<0.05$

图4　*CEMIP*可能调控的恶性生物学过程

对照组比较,CRISPRi抑制组1、CRISPRi抑制组2细胞CEMIP蛋白表达显著下调($P<0.05$,图5B、C)。CCK-8、Transwell迁移及侵袭实验评估干预超级增强子活性对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响,结果表明:与对照组比较,CRISPRi抑制组1、CRISPRi抑制组2细胞增殖能力、迁移能力及侵袭能力均显著降低($P<0.05$,图5D~H)。Western blot检测EMT通路相关蛋白水平结果显示:CRISPRi抑制组1、CRISPRi抑制组2细胞间质细胞标志物N-cadherin表达下调,上皮细胞标志物E-cadherin表达上调($P<0.05$,图5B、C),提示超级增强子可通过调控*CEMIP*的表达调节EMT通路,促进胃癌细胞的转移。抑制*CEMIP*超级增强子区域H3K27ac活性后,由*CEMIP*所调控的增殖、转移、侵袭等生物学过程亦受到抑制。



1:对照组;2:CRISPRi 抑制组 1;3:CRISPRi 抑制组 2;a:$P<0.05$,与对照组比较

A:*CEMIP* 超级增强子区域 H3K27ac 活性抑制细胞系构建模式图;B、C:Western blot 检测各组 CEMIP、N-cadherin、E-cadherin 蛋白表达及定量分析;D:CCK-8 实验检测各组细胞增殖情况;E、F:Transwell 迁移实验观测各组细胞的迁移能力;G、H:Transwell 侵袭实验观测各组细胞的侵袭能力

图 5 超级增强子可上调 CEMIP 表达对细胞增殖和迁移的促进作用

3 讨论

3.1 超级增强子重塑在肠型胃癌发生发展中的重要作用

肿瘤的发生发展是一系列复杂的过程,癌变进展过程中序贯性积累基因突变和表观遗传学改变。表观遗传是在不改变 DNA 序列的情况下调节基因表达,维持遗传稳定。表观遗传的重塑往往通过活性基因组元件来达到调控基因表达的目的,其中超级增强子的重塑尤为重要。超级增强子的基本组成元件是增强子:一种相对保守的位于基因上游或下游的短片段 DNA。其富含 H3K27ac 组蛋白修饰,可通过招募特异的转录因子与基因启动子形成特定环路,激活或增强靶基因转录,从而决定细胞命运与组织形态。超级增强子通常由多个普通增强子连接在一起,是一组更强大、更密集的富集转录因子结合位点的增强子群体,

形成更高级别的调控单位,放大靶基因的表达水平。超级增强子重塑是肿瘤细胞的特征之一,相对于普通增强子,其能更高程度地改变基因表达网络、调控促癌相关基因的异常表达,赋予细胞无限增殖、侵袭转移以及抵抗免疫应答的能力。

肠型胃癌是胃癌中发病率较高的病理学亚型,其发生发展的表观调控机制尚不清楚。超级增强子作为表观调控的重要方式,在肠型胃癌中研究尚少,其重塑状态和功能调控亟待深入挖掘。本研究利用高质量CUT&Tag H3K27ac测序数据,系统描绘肠型胃癌组织中的超级增强子重塑图谱,发现肿瘤组织获得性超级增强子可能参与免疫系统的负向调节、淋巴细胞增殖的负向调节、细胞黏附、雌激素代谢等生物学过程,提示超级增强子重塑可能广泛影响肿瘤发生发展的各个环节;本研究还发现超级增强子重塑可能调控*MYC*、*CDX2*、*ERBB2*等胃癌相关基因的表达,这些发现与既往报道一致[30],表明获得性超级增强子可通过调控关键基因的表达发挥其促进肿瘤发生发展的功能。系统研究超级增强子对肠型胃癌的表观调控机制,有助于更全面地认识肠型胃癌的表观重塑特征、挖掘新的靶向目标、并基于此开发肿瘤干预新技术,对于肠型胃癌的精准治疗具有一定指导意义。

3.2 超级增强子通过调控*CEMIP*表达促进胃癌细胞的恶性生物学行为

*CEMIP*基因编码细胞迁移诱导蛋白,可参与透明质酸的降解,其异常高表达与肿瘤发生、侵袭及淋巴结转移显著相关[31]。大量研究发现,*CEMIP*在乳腺癌、结直肠癌、胰腺癌、肺癌中表达上调,可促进肿瘤细胞增殖和迁移,其机制与该基因激活Wnt/β-catenin信号通路、调节EMT中基质金属蛋白酶家族活性[32]、促进糖原分解[33]、调节细胞周期等过程[34]有关。本研究同样发现,胃癌肿瘤细胞中*CEMIP*表达上调,高表达*CEMIP*的肿瘤细胞亚群具有更高的细胞黏附、免疫逃逸等恶性生物学行为评分以及激素和脂肪酸代谢活性。以上研究结果表明,*CEMIP*可通过多种途径调控细胞恶性生物学行为,对于肿瘤发生发展具有广泛的功能和潜力。尽管大量研究已证实*CEMIP*的促癌作用,由于目前针对*CEMIP*的靶向治疗尚未成熟,其治疗效果仍不理想。因此,从超级增强子活性角度出发,深入研究该基因的转录调控机制,通过*CEMIP*上游表观调控元件实现基因表达干预,在超级增强子的基础上进行靶向干预治疗探索,有望为临床肿瘤治疗提供新的思路。

本研究通过描绘肠型胃癌组织超级增强子重塑特征,发现促癌相关基因*CEMIP*可能受到超级增强子的调控,进一步利用CRISPRi技术对*CEMIP*超级增强子区域H3K27ac活性进行抑制,验证了超级增强子可通过调控*CEMIP*的表达促进细胞增殖、迁移、侵袭等恶性生物学过程。针对该超级增强子进行干预,可下调*CEMIP*表达,从而发挥抑癌作用。本研究也有一定局限性,超级增强子区域H3K27ac修饰状态的改变往往伴随着转录因子富集模式的转变,探索超级增强子区域转录因子富集度、锁定关键转录因子,有助于进一步揭示*CEMIP*等重要促癌基因的表观调控机制,为解析肿瘤生物学行为提供更加深入的理论依据。

利益冲突 本文所有作者申明不存在利益冲突

参考文献:

[1] HAN B F, ZHENG R S, ZENG H M, *et al*. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4(1): 47-53. DOI: 10.1016/j.jncc.2024.01.006.

[2] 王磊,万凌红,王涛,等.新辅助免疫化疗对比新辅助化疗用于局部进展期胃癌的临床疗效分析[J].陆军军医大学学报,2024,46(20):2313-2321.DOI:10.16016/j.2097-0927.202405076.
WANG L, WAN L H, WANG T, *et al*. Clinical efficacy of neoadjuvant immunochemotherapy versus neoadjuvant chemotherapy for local advanced gastric adenocarcinoma[J].J Amry Med Univ,2024,46(20):2313-2321.DOI:10.16016/j.2097-0927.202405076.

[3] BUSINELLO G, ANGERILLI V, PARENTE P, *et al*. Molecular landscapes of gastric pre-neoplastic and pre-invasive lesions[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 9950. DOI: 10.3390/ijms22189950.

[4] FEINBERG A P, LEVCHENKO A. Epigenetics as a mediator of plasticity in cancer[J]. Science, 2023, 379(6632): eaaw3835. DOI: 10.1126/science.aaw3835.

[5] 刘文康,吴林育,喻博,等.胃黏膜肠上皮化生的H3K27ac增强子重编程特征及转录调控机制[J].陆军军医大学学报,2023,45(6):500-509. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202210071.
LIU W K, WU L Y, YU B, *et al*. Reprogramming characteristics of H3K27ac-marked enhancer in gastric intestinal metaplasia and its transcriptional regulatory mechanism[J]. J Army Med Univ, 2023, 45(6): 500-509. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202210071.

[6] CHEN S F, ZHOU Y Q, CHEN Y R, *et al*. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884-i890. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty560.

[7] MARTIN M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads[J]. EMBnet J, 2011, 17(1): 10. DOI: 10.14806/ej.17.1.200.

[8] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with bowtie 2[J]. Nat Methods, 2012, 9(4): 357-359. DOI: 10.1038/nmeth.1923.

[9] DANECEK P, BONFIELD J K, LIDDLE J, *et al*. Twelve years of SAMtools and BCFtools[J]. Gigascience, 2021, 10(2): giab008. DOI: 10.1093/gigascience/giab008.

[10] JEON H, LEE H, KANG B, *et al*. Comparative analysis of commonly used peak calling programs for ChIP-Seq analysis [J]. Genomics Inform, 2020, 18(4): e42. DOI: 10.5808/GI.2020.18.4.e42.

[11] KAYA-OKUR H S, JANSSENS D H, HENIKOFF J G, *et al*. Efficient low-cost chromatin profiling with CUT&Tag [J]. Nat Protoc, 2020 ,15(10):3264-3283. DOI: 10.1038/s41596-020-0373-x.

[12] YU G C, WANG L G, HE Q Y. ChIPseeker: an R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization[J]. Bioinformatics, 2015, 31(14): 2382-2383. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv145.

[13] KOPYLOVA E, NOÉ L, TOUZET H. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data[J]. Bioinformatics, 2012, 28(24): 3211-3217. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts611.

[14] KIM D, PAGGI J M, PARK C, *et al*. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype [J]. Nat Biotechnol, 2019, 37(8): 907-915. DOI: 10.1038/s41587-019-0201-4.

[15] WANG L G, WANG S Q, LI W. RSeQC: quality control of RNA-seq experiments[J]. Bioinformatics, 2012, 28(16): 2184-2185. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts356.

[16] LIAO Y, SMYTH G K, SHI W. FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features[J]. Bioinformatics, 2014, 30(7): 923-930. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt656.

[17] BRIEND M, RUFIANGE A, MONCLA L M, *et al*. Connectome and regulatory hubs of CAGE highly active enhancers[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 5594. DOI: 10.1038/s41598-023-32669-3.

[18] TU S Q, LI M S, CHEN H J, *et al*. MAnorm2 for quantitatively comparing groups of ChIP-seq samples [J]. Genome Res, 2021, 31(1): 131-145. DOI: 10.1101/gr.262675.120.

[19] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. Genome Biol, 2014, 15(12): 550. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8.

[20] YU G C, WANG L G, HAN Y Y, *et al*. ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. OMICS, 2012, 16(5): 284-287. DOI: 10.1089/omi.2011.0118.

[21] HAO Y H, STUART T, KOWALSKI M H, *et al*. Dictionary learning for integrative, multimodal and scalable single-cell analysis[J]. Nat Biotechnol, 2024, 42(2): 293-304. DOI: 10.1038/s41587-023-01767-y.

[22] MCGINNIS C S, MURROW L M, GARTNER Z J. DoubletFinder: doublet detection in single-cell RNA sequencing data using artificial nearest neighbors[J]. Cell Syst, 2019, 8(4): 329-337. e4. DOI: 10.1016/j. cels. 2019.03.003.

[23] KORSUNSKY I, MILLARD N, FAN J, *et al*. Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony[J]. Nat Methods, 2019, 16(12): 1289-1296. DOI: 10.1038/s41592-019-0619-0.

[24] HUANG Q H, LIU Y, DU Y H, *et al*. Evaluation of cell type annotation R packages on single-cell RNA-seq data[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2021, 19(2): 267-281. DOI: 10.1016/j.gpb.2020.07.004.

[25] WANG R P, SONG S M, QIN J J, *et al*. Evolution of immune and stromal cell states and ecotypes during gastric adenocarcinoma progression [J]. Cancer Cell, 2023, 41(8): 1407-1426.e9. DOI: 10.1016/j.ccell.2023.06.005.

[26] ZHANG M, HU S F, MIN M, *et al*. Dissecting transcriptional heterogeneity in primary gastric adenocarcinoma by single cell RNA sequencing [J]. Gut, 2021, 70(3): 464-475. DOI: 10.1136/gutjnl-2019-320368.

[27] WU Y C, YANG S X, MA J Q, *et al*. Spatiotemporal immune landscape of colorectal cancer liver metastasis at single-cell level[J]. Cancer Discov, 2022, 12(1): 134-153. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-0316.

[28] YUAN H, YAN M, ZHANG G,*et al*. CancerSEA: a cancer single-cell state atlas[J].Nucleic Acids Res, 2019,47(D1): D900-D908. DOI: 10.1093/nar/gky939.

[29] ZHAO W Z, JIA Y F, SUN G Y, *et al*. Single-cell analysis of gastric signet ring cell carcinoma reveals cytological and immune microenvironment features [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 2985. DOI: 10.1038/s41467-023-38426-4.

[30] 陈旭, 储召乐, 秦苾珺, 等. 增强子及相关调控组在肠型胃癌中的重塑特征及其预后预测模型[J]. 陆军军医大学学报, 2024, 46(7): 695-704. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202309147.
CHEN X, CHU Z L, QIN B J, *et al*. Remodeling characteristics and construction of a survival prediction model based on enhancers and regulome in intestinal type gastric cancer[J]. J Army Med Univ, 2024, 46(7): 695-704. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202309147.

[31] CHEN Y, ZHOU H, JIANG W J, *et al*. The role of CEMIP in tumors: an update based on cellular and molecular insights [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 146: 112504. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112504.

[32] JIA S Q, QU T T, WANG X H, *et al*. KIAA1199 promotes migration and invasion by Wnt/β-catenin pathway and MMPs mediated EMT progression and serves as a poor prognosis marker in gastric cancer[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0175058. DOI: 10.1371/journal.pone.0175058.

[33] TERASHIMA M, FUJITA Y, TOGASHI Y, *et al*. KIAA1199 interacts with glycogen phosphorylase kinase β-subunit (PHKB) to promote glycogen breakdown and cancer cell survival [J]. Oncotarget, 2014, 5(16): 7040-7050. DOI: 10.18632/oncotarget.2220.

[34] JAMI M S, HOU J X, LIU M, *et al*. Functional proteomic analysis reveals the involvement of KIAA1199 in breast cancer growth, motility and invasiveness[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 194. DOI: 10.1186/1471-2407-14-194.

(收稿:2024-07-15;修回:2024-10-23)
(编辑 汪勤俭)